

グリホサート試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

グリホサート

2. 適用食品

畜水産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

強酸性陽イオン交換樹脂（粒径37～74 μm） カラムクロマトグラフィー用に製造した強酸性陽イオン交換樹脂（粒径37～74 μm）を2 mol/L水酸化ナトリウムに浸し一晩放置した後、水を用いて洗液のpHが中性になるまで洗う。次いで2 mol/L塩酸に浸し一晩放置した後、水を用いて洗液のpHが中性になるまで洗ったものを水に懸濁して冷暗所に保管する。

グリホサート標準品 本品はグリホサート95%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

試料10.0 g（脂肪は5.00 g）に水100 mL及びジクロロメタン50 mLを加え、ホモジナイズした後、毎分2,500回転で10分間遠心分離を行い、水層を採る。残留物及びジクロロメタン層に水50 mLを加えてホモジナイズした後、上記と同様に遠心分離する。水層を採り、先の水層に合わせた後、水を加えて正確に200 mLとする。

2) 精製

① 強酸性陽イオン交換クロマトグラフィー

内径10 mm、長さ300 mmのクロマトグラフ管に、強酸性陽イオン交換樹脂（粒径37～74 μm）12 mLを水に懸濁したものを入れ、カラムの上端に少量の水が残る程度まで水を流出させる。このカラムに1) で得られた溶液を正確に2 mLを注入し、流出液は捨てる。さらに水2 mLを注入し流出液は捨てる。次いで水7 mLを注入し溶出液を採る。

② オクタデシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（500 mg）にメタノール及び水各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに①で得られた溶液を注入した後、さらに水5 mLを注入し、全溶出液を50℃以下で濃縮乾固する。

3) 誘導體化

2)②で得られた残留物に酢酸1 mL及びオルト酢酸トリメチル4 mLを加え、密栓し100℃で2時間加熱する。放冷後、50℃以下で濃縮乾固する。この残留物にアセトン及び酢酸エチル（3：17）混液5 mLを加えて溶かす。

4) グリホサート誘導体化物の精製

エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム (500 mg) の下にフロリジルミニカラム (910 mg) を連結し、アセトン及び酢酸エチル各5 mLを順次注入し、流出液は捨てる。このカラムに3) で得られた溶液を注入した後、さらにアセトン及び酢酸エチル (3 : 17) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。エチレンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラムを外し、フロリジルミニカラムにアセトン及び酢酸エチル (1 : 1) 混液10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで、アセトン及びメタノール (4 : 1) 混液10 mLを注入し、溶出液を40℃以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物を0.01 vol%ギ酸に溶かし、正確に2 mL (脂肪は1 mL) としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

グリホサート標準品を水に溶解して500 mg/Lとし、標準原液とする。標準原液を水で希釈して20 mg/Lの溶液を調製する。この1 mLを分取し、50℃以下で濃縮乾固した後、酢酸1 mL及びオルト酢酸トリメチル4 mLを加え、密栓し100℃で2時間加熱する。放冷後、50℃以下で濃縮乾固する。この残留物を0.01 vol%ギ酸を加えて溶かし、さらに0.01 vol%ギ酸で希釈した溶液 (グリホサートとしての濃度) を数点調製し、それぞれをLC-MS/MSに注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01 mg/kgに相当する試験溶液中濃度は0.0005 mg/Lである。

7. 定量

試験溶液をLC-MS/MSに注入し、6. の検量線でグリホサートの含量を求める。

8. 確認試験

LC-MS/MSにより確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径2.0 mm、長さ150 mm、粒子径5 µm

カラム温度 : 40℃

移動相 : アセトニトリル及び0.01 vol%ギ酸 (7 : 93) 混液

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (*m/z*) : プリカーサーイオン 254、プロダクトイオン212、102

注入量 : 4 µL

保持時間の目安 : 8分

10. 定量限界

0.01 mg/kg

11. 留意事項

1) 試験法の概要

グリホサートを試料からジクロロメタン存在下、水で抽出した後、強酸性陽イオン交換カラム及びオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムで精製する。誘導体化し、エチレ

ンジアミン-*N*-プロピルシリル化シリカゲルミニカラム及びフロリジルミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで定量及び確認する方法である。

2) 注意点

- ① グリホサートは水への溶解度が非常に高いことから、抽出溶媒には水を選択した。しかし、水のみでの抽出では、畜水産物の固体試料において、試料との混和が十分でないことから、有機溶媒を同時に加えて抽出する方法を検討した。有機溶媒として、*n*-ヘキサン、酢酸エチル及びジクロロメタンについて検討したところ、*n*-ヘキサン及び酢酸エチルでは一部の食品で有機層がゲル化し有機層と水層の分離が困難であった。一方、ジクロロメタンではゲル化が低減され、有機層と水層の分離が可能であったことから、添加する有機溶媒にはジクロロメタンを採用した。
- ② 強酸性陽イオン交換カラムに用いる樹脂はH型を用い、アルカリ溶液、水及び酸性溶液で洗浄してから使用する。
- ③ 誘導体化反応は密栓条件で実施するため、反応中の危険を回避するため、栓が飛ばないようにクランプで固定し、栓の上にタオルを掛け、さらにその上から平板状の重りを載せるなどの対処をすることが望ましい。
- ④ グリホサートのLC-MS/MS測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。
定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン254、プロダクトイオン102
定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン254、プロダクトイオン212
- ⑤ 試験法開発時に検討した食品 : 牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳、鶏の筋肉・卵、さけ、うなぎ、しじみ及びはちみつ

12. 参考文献

厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 食安発第0124001号「グリホサート試験法（農産物）」（平成17年1月24日）

13. 類型

C